



Prof. dr hab. Marta Miączyńska
Laboratorium Biologii Komórki
Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej
w Warszawie

Warszawa, 27.10.2020 r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej pani mgr Marii Billert

p.t.: „Feniksyna jako modulator elementów osi adipoinsularnej”

wykonanej pod kierunkiem pana dr. hab. Marka Skrzypskiego

w Katedrze Fizjologii, Biochemii i Biostruktury Zwierząt

Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu

Rozprawa doktorska pani mgr Marii Billert poświęcona jest charakterystyce działania feniksyny (PNX) na komórki tłuszczowe (adipocyty) oraz komórki beta wysp trzustki. Feniksyna to neuropeptyd odkryty zaledwie siedem lat temu, wyizolowany z podwzgórza, choć występuje także w wielu innych organach. Choć początkowo opisano działanie feniksyny w procesach reprodukcji, to jej aktywność wydaje się plejotropowa i nakierowana na różne komórki, tkanki i organy. Punktem wyjścia dla rozprawy pani Billert było odkrycie podwyższonego stężenia układowego feniksyny u osób otyłych oraz regulacji pobierania pokarmu i metabolizmu energetycznego przez feniksynę u zwierząt. Doktorantka postawiła więc hipotezę, że feniksyna działa na adipocyty i komórki beta trzustki czyli komórki stanowiące dwa trzony osi adipoinsularnej, a feniksyna moduluje produkcję insuliny i leptyny jako głównych regulatorów tej osi. Aby zweryfikować tę hipotezę, pani Billert wykonała serie dobrze zaplanowanych eksperymentów, których wyniki potwierdziły słuszność jej podstawowych założeń. W ten sposób Doktorantka udowodniła, że feniksyna jest modulatorem osi adipoinsularnej, co jest ważnym odkryciem. Należy podkreślić, że badania opisane w rozprawie są bardzo aktualne i dotyczą istotnego problemu naukowego, zostały zrealizowane zgodnie ze sztuką, a ich wyniki opublikowano jako dwie prace w liczącym się międzynarodowym czasopiśmie *Biochimica et Biophysica Acta*. Mimo krótkiego czasu od ich publikacji (grudzień 2018 i grudzień 2019), obie prace były już cytowane odpowiednio 10 i 5 razy, co świadczy o ich zauważeniu w międzynarodowym środowisku naukowym oraz potwierdza wagę podjętej tematyki. Z tych względów odkrycia pani Billert opisane w niniejszej rozprawie mają dużą wartość poznawczą i stanowią cenny przyczynek do światowej literatury przedmiotu.

Formalny opis rozprawy

Podstawową część rozprawy stanowi spójny tematycznie cykl dwóch pierwszoautorskich artykułów Doktorantki oraz krótkie zestawienie wyników niepublikowanych. Są to następujące artykuły:

Billert M, Kołodziejcki PA, Strowski MZ, Nowak KW, Skrzypski M (2019) Phoenixin-14 stimulates proliferation and insulin secretion in insulin producing INS-1E cells. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 1866(12):118533. doi: 10.1016/j.bbamcr.2019.118533.

Billert M, Wojciechowicz T, Jaszczewski M, Szczepankiewicz D, Waśko J, Kaźmierczak S, Strowski MZ, Nowak KW, Skrzypski M (2018) Phoenixin-14 stimulates differentiation of 3T3-L1 preadipocytes via cAMP/Epac-dependent mechanism. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 1863(12):1449-1457. doi: 10.1016/j.bbalip.2018.09.006.

Główna część rozprawy liczy 102 strony maszynopisu. Rozprawa rozpoczyna się wykazem stosowanych skrótów oraz streszczeniami w językach polskim i angielskim. Jej kolejnymi rozdziałami są: Wstęp (23 strony), Hipotezy i cele badań (2 strony), Materiały i metody badawcze (13 stron), Wyniki badań (7 stron), Dyskusja (19 stron), Wnioski (3 strony), Podsumowanie (2 strony) oraz Literatura (273 pozycji).

Po tych rozdziałach zamieszczono obie publikacje oraz oświadczenia ich wszystkich współautorów. Udział pani Billert w obu pracach został oszacowany na 60%, co wskazuje na Jej kluczową rolę w planowaniu i wykonaniu większości doświadczeń, analizie i interpretacji ich wyników, a także przygotowaniu manuskryptów.

Ocena merytoryczna

Wstęp składa się z trzech rozdziałów opisujących kolejno: rolę komórek beta trzustki i adipocytów w homeostazie glukozy, udział neuropeptydów w regulacji czynności tych komórek oraz właściwości feniksyny jako neuropeptydu o plejotropowych właściwościach. Wstęp jest ilustrowany dwoma rycinami oraz dwoma tabelami. Generalnie, ta część rozprawy stanowi bardzo obszerne kompendium wiedzy na temat osi adipoinsularnej. Na podkreślenie zasługuje szeroki wachlarz omawianego piśmiennictwa (167 pozycji). Dobór treści jest prawidłowy i dzięki temu Wstęp dobrze wprowadza czytelnika w zagadnienia omawiane w rozprawie. W zrozumieniu złożonych zagadnień regulacji osi adipoinsularnej pomagają dwie obszerne tabele (Tabela 1 Charakterystyka insuliny i leptyny oraz Tabela 2 Wpływ wybranych neuropeptydów na procesy biologię adipocytów i komórek beta trzustki, pobieranie pokarmu, sekrecję adipokin i insuliny oraz inne funkcje biologiczne), które stanowią przejrzyste podsumowanie omawianych treści. Wstęp wskazuje na dużą wiedzę Doktorantki w przedmiocie swych badań.

Nie mam zastrzeżeń merytorycznych do tej części rozprawy. Z obowiązku recenzenta wspomnę jedynie o bardzo drobnych uchybieniach edytorskich: niewyjaśniony skrót NEFA (Ryc. 2, str 26), sprzężenia (str. 19, 25) zamiast sprężenia, ilość oocytów (str. 38, zamiast liczba oocytów, ponieważ są policzalne). Nie było też dla mnie jasne stwierdzenie opisujące odkrycie feniksyny: „Sekwencja peptydu została opracowana za pomocą narzędzi bioinformatycznych” (str. 36) – wydaje mi się, że słowo „opracowana” jest tutaj mylące, a określenia „przewidziana” czy „zidentyfikowana” byłyby bardziej adekwatne.

Hipotezy i cele badań zostały poprawnie sformułowane i jasno przedstawione, w podziale dla dwóch publikacji i trzeciej części badań nieopublikowanych. Założone cele zostały zrealizowane w toku badań.

W szesnastu podrozdziałach **Materiałów i metod badawczych** Doktorantka przedstawiła swój warsztat doświadczalny, który obejmował hodowle ustalonych linii komórkowych i pierwotnych preadipocytów, izolację wysp trzustkowych szczura, analizy ekspresji genów z użyciem qPCR, analizy białek Western blot, analizy mikroskopowe (immunofluorescencja) oraz liczne testy komórkowe (prolifracja, przeżywalność i śmierć komórek, sekrecja insuliny i feniksyny, pomiar cAMP, barwienie lipidów czerwieńią oleistą) oraz analizy statystyczne. Zastosowane metody zostały poprawnie dobrane do założonych celów. Opis metod wydaje się stosunkowo dokładny i wystarczająco szczegółowy do powtórzenia doświadczeń, a użyte startery, sondy i przeciwciała zostały przedstawione w tabelach wraz z niezbędnymi danymi.

W krótkim rozdziale **Wyniki badań** Doktorantka zwięźle opisała wyniki zaprezentowane w obu załączonych publikacjach. Artykuły te zostały poddane procedurze oceny peer review przez publikujące czasopismo, stąd moje uwagi do tej części są bardzo nieliczne.

Publikacja 1:

Billert M, Kołodziejski PA, Strowski MZ, Nowak KW, Skrzypski M (2019) Phoenixin-14 stimulates proliferation and insulin secretion in insulin producing INS-1E cells. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 1866(12):118533. doi: 10.1016/j.bbamcr.2019.118533.

W publikacji tej udowodniono znaczenie feniksyny w fizjologii preadipocytów i adipocytów, stosując mysie preadipocyty linii 3T3-L1 oraz pierwotne preadipocyty szczurze. W komórkach tych wykrywalne jest zarówno mRNA prekursora feniksyny Smim20 oraz sam peptyd feniksyny, który jest przez nie wydzielany. Feniksyna stymuluje proliferację i przeżywalność preadipocytów, hamuje ich śmierć, zwiększa ekspresję genów uczestniczących w adipogenezie (Ppar γ , C/ebp β i Fabp4), wewnątrzkomórkową zawartość lipidów oraz poziom cAMP. Na poziomie molekularnym, efekty działania feniksyny nie zależą od aktywności kinazy Akt, ale są osłabione po zastosowaniu inhibitora białka Epac, wskazując na udział szlaku cAMP/Epac jako jednego z możliwych mechanizmów działania feniksyny.

Publikacja jest napisana w sposób jasny, a przedstawione wyniki są przekonujące i dobrze zinterpretowane. Mam następujące pytania do Doktorantki:

- Ryc. 3, analiza śmierci komórkowej po zastosowaniu feniksyny. Na wykresie poziom śmierci określono w jednostkach absorbancji. Czy wiadomo jak duża jest populacja preadipocytów linii 3T3-L1, która ulega śmierci w hodowli (zakładam, że jest to proces endogeny) i jak bardzo feniksyna zmienia odsetek komórek umierających?

- Ryc. 6, analiza sygnalizacji szlaku Akt po podaniu feniksyny. Ponieważ nie zaobserwowano aktywacji kinazy Akt (a przynajmniej jej fosforylacji na badanej reszcie treoniny 308), czy zastosowano kontrolę pozytywną w postaci znanego stymulanta powodującego aktywację Akt w tych komórkach? Taka kontrola pozwoliłaby także jednoznacznie stwierdzić, że zastosowany inhibitor LY294002 rzeczywiście miał oczekiwane działanie hamujące w danym modelu eksperymentalnym. Wreszcie, dlaczego badano fosforylację Thr308, podczas gdy w kolejnej publikacji – Ser 473 kinazy Akt?

Publikacja 2:

Billert M, Wojciechowicz T, Jasaszwili M, Szczepankiewicz D, Waśko J, Kaźmierczak S, Strowski MZ, Nowak KW, Skrzypski M (2018) Phoenixin-14 stimulates differentiation of 3T3-L1 preadipocytes via cAMP/Epac-dependent mechanism. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 1863(12):1449-1457. doi: 10.1016/j.bbalip.2018.09.006.

W publikacji tej określono znaczenie feniksyny dla fizjologii komórek beta trzustki, z użyciem komórek beta linii INS-1E, min6 oraz izolowanych wysp trzustki szczura. Potwierdzono w nich obecność mRNA prekursora feniksyny, a za pomocą barwień immunofluorescencyjnych - obecność samej feniksyny. Zwiększone stężenie glukozy stymuluje wydzielanie feniksyny z wysp trzustkowych. Co ciekawe, feniksyna jest wykrywalna w komórkach alfa i beta trzustki wydzielających odpowiednio glukagon i insulinę. Feniksyna podnosi poziom mRNA insuliny, a także wzmacnia wydzielanie insuliny pod wpływem glukozy w komórkach INS-1E oraz izolowanych wyspach trzustki. Wydzielanie insuliny jest hamowane przez inhibitor białka Epac, wskazując na udział szlaku cAMP/Epac w tym procesie. Ponadto, feniksyna stymuluje proliferację komórek linii INS-1E i min6 w procesie angażującym szlaki sygnałowe ERK1/2 oraz Akt.

Podobnie jak w przypadku poprzedniej publikacji, także ta praca jest napisana klarownie, a przedstawione wyniki są dobrze zinterpretowane. Chciałabym dowiedzieć się od Doktorantki dlaczego w tych badaniach wybrała fosforylację na reszcie seryny 473 jako miarę aktywności kinazy Akt? Z kwestii technicznych, w rozprawie można było dla wygody czytelnika zamieścić także rycinę suplementarną nr 1 do tej publikacji, której zabrakło.

Dane niepublikowane:

Trzecia, krótka część rozprawy obejmuje dane opisujące zależności pomiędzy feniksyną a leptyną, przedstawione na dwóch rycinach. Doktorantka wykazała, że feniksyna hamuje ekspresję genu kodującego leptynę oraz produkcję leptyny w dojrzałych adipocytach linii 3T3-L1. Z kolei leptyna wzmacnia wydzielanie feniksyny przez komórki beta linii INS-1E. Te ciekawe dane są z pewnością zaczątkiem kolejnej publikacji.

Istotną częścią rozprawy jest **Dyskusja**, obejmująca cztery podrozdziały, omawiające kolejno wyniki opisane w dwóch publikacjach, dodatkowe dane niepublikowane oraz ograniczenia przeprowadzonych badań. Dyskusja jest rzetelnym opracowaniem, w którym uzyskane wyniki są interpretowane w szerszym kontekście dostępnej literatury przedmiotu. Podobnie jak Wstęp, również Dyskusja jest oparta na bogatym piśmiennictwie. Doktorantka trafnie identyfikuje rozbieżności pomiędzy swoimi rezultatami a danymi literaturowymi, omawiając ich możliwe przyczyny. Nie mam zasadniczych zastrzeżeń do tej części rozprawy, która świadczy o wiedzy i dojrzałości naukowej Doktorantki. Jedyne czego mi zabrakło to zdefiniowanie możliwych kierunków przyszłych badań w oparciu o uzyskane przez Nią wyniki. Jakim zdaniem Doktorantki byłyby priorytetowe pytania i dalsze hipotezy? Jakie techniki doświadczalne należałoby zastosować i rozwinąć aby na takie pytania odpowiedzieć? Jakie doświadczenia można byłoby przeprowadzić aby z jednej strony lepiej poznać

mechanizmy molekularne działania feniksyny, a z drugiej skutki jej działania *in vivo* na poziomie organów i organizmu? Chciałabym poznać opinię Doktorantki na te tematy podczas obrony.

Wnioski obejmują siedem punktów, a całość wyników rozprawy jest przedstawiona w przejrzysty sposób na schemacie (Ryc. 6), który stanowi graficzne streszczenie badań. Rozprawę kończy zwięzłe **Podsumowanie**.

Ocena edytorskiej strony rozprawy

Pod względem edytorskim, praca jest napisana bardzo starannie, poprawnym językiem polskim w częściach polskojęzycznych. Również dwie anglojęzyczne publikacje zostały profesjonalnie przygotowane. Oprócz niezwykle drobnych usterek wymienionych powyżej nie mam zastrzeżeń do strony edytorskiej rozprawy.

Podsumowanie

Rozprawa doktorska pani mgr Marii Billert podejmuje istotny problem naukowy z pogranicza fizjologii organizmu i biologii komórki. Wyniki uzyskane przez Doktorantkę są bardzo wartościowe, gdyż odsłaniają nowe funkcje feniksyny jako modulatora działania osi adipoinsubularnej i otwierają ciekawe perspektywy dalszych badań. Przedstawione w rozprawie doświadczenia zostały poprawnie zaplanowane, wykonane i zinterpretowane, co jest potwierdzone faktem ich publikacji w formie dwóch artykułów w uznanym czasopiśmie międzynarodowym. Należy podkreślić, że oprócz tych pierwszoautorskich prac stanowiących podstawę niniejszej rozprawy, Doktorantka jest współautorką licznych dalszych publikacji w swojej dziedzinie, co świadczy o Jej dużej aktywności naukowej. Dorobek publikacyjny i obecna rozprawa niewątpliwie potwierdzają dużą wiedzę teoretyczną, sprawność eksperymentalną i dojrzałość naukową pani mgr Billert.

Stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim i wnoszę do Rady Naukowej Dyscypliny Biologia Wydziału Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu o dopuszczenie mgr Marii Billert do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Z uwagi na wysoką wartość rozprawy wnioskuję o jej wyróżnienie stosowną nagrodą.

Krzysztof Kozłowski